

24. 8. 2004

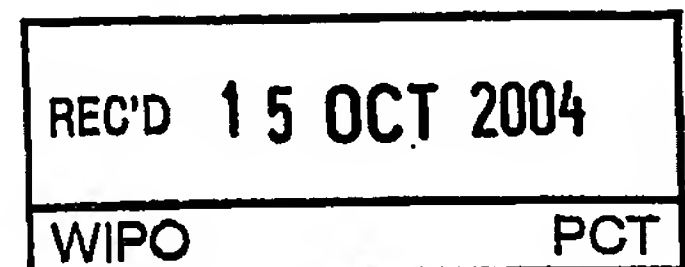
日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年12月15日

出願番号  
Application Number: 特願2003-416228  
[ST. 10/C]: [JP2003-416228]



出願人  
Applicant(s): 有限会社ジーン・フィールド

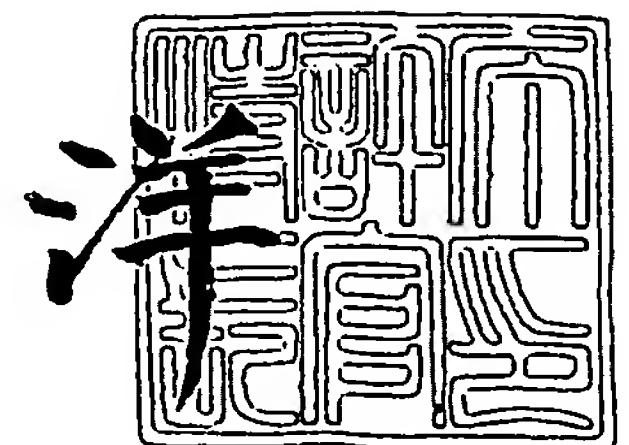
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 BVCA0301Y1  
【提出日】 平成15年12月15日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県鳩ヶ谷市坂下町 4 - 5 - 1   P r e n d r e . S 6 0 1 号  
                    室  
    【氏名】 根本 直人  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県川口市上青木西 1 - 1 9 - 3 9   滝澤ビル 4 0 2  
    【氏名】 山口 淳一  
【特許出願人】  
    【識別番号】 502441488  
    【氏名又は名称】 バイオビジョン・キャピタル株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100102978  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100108774  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003-205139  
    【出願日】 平成15年 7月31日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 041092  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項1】

システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

(a) 少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピューロマイシン連結体(群)を得る工程；

(b) 工程(a)で得られたmRNA-ピューロマイシン連結体(群)と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を調製する工程；及び

(c) 工程(b)において調製されたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)と1以上の標的物質とを接触させ、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；

を含む上記スクリーニング方法。

## 【請求項2】

工程(c)に続いて、さらに、(d)前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含むmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)のmRNAから逆転写によりDNAを調製し、さらにそのDNAに変異を導入することによって改変された配列を有するmRNAを調製し、このmRNAを工程(a)に供することによって、標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

(a) 少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピューロマイシン連結体(群)を得る工程；

(b) 工程(a)で得られたmRNA-ピューロマイシン連結体(群)と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を調製する工程；

(c) 工程(b)で得られたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)のmRNAから逆転写によりDNAを調製し、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体を調製する工程；及び

(d) 工程(c)において調製されたDNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)と1以上の標的物質とを接触させ、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；

を含む上記スクリーニング方法。

## 【請求項4】

工程(d)に続いて、さらに、(e)前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含むDNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)におけるDNAに変異を導入することによって改変された配列を有するmRNAを調製し、このmRNAを工程(a)に供することによって、標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記請求項3に記載の方法。

## 【請求項5】

工程(a)において、前記mRNA-ピューロマイシン連結体が、mRNAの3'末端にスパーサーを介してピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結した構造である前記請求項1～4のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6】**

工程 (a) において、前記 mRNA が、2 以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードする DNA から転写されることによって調製される、前記請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7】**

工程 (b) において用いられる翻訳系が無細胞翻訳系である、前記請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 8】**

前記タンパク質と前記標的物質とが相互作用しているか否かの判定が、アフィニティークラムクロマトグラフィー法又はアフィニティービーズ法によって両者が結合しているか否かを判断することによって行われる、前記請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 9】**

相互作用していると判断されたタンパク質及び／又は標的物質を同定する工程をさらに含む、前記請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 DNA の変異が Error-Prone PCR によって行われる、前記請求項 2、または 4～9 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 11】**

前記の各工程を複数回繰り返すことによって標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記請求項 1～10 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 12】**

前記 mRNA が、8～500 個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～11 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 13】**

前記 mRNA が、10～200 個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～12 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 14】**

前記 mRNA が、2～10 個のシステイン残基を有するタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～13 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 15】**

前記 mRNA が、隣接するシステイン残基がそれぞれ 2～20 個離れて存在するようにアミノ酸配列中に分散しているタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～14 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 16】**

前記 mRNA が、最も N 末端側に位置するシステイン残基と最も C 末端側に位置するシステイン残基が 5～50 個離れているタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～15 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 17】**

前記スパーサーが、ポリヌクレオチド、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリスチレン、ペプチド核酸又はこれらの組合せを主骨格として含むものである、前記請求項 5～16 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 18】**

前記スパーサーは固相結合部位を有し、前記 mRNA-ピュロマイシン連結体が、その固相結合部位を介して固相に結合されている、前記請求項 5～17 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 19】**

前記固相が、スチレンビーズ、ガラスビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、磁性体ビーズ、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板、ガラス容器、プラスチック容器及びメンブレンから選択される、前記請求項 18 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記スペーサーの固相結合部位が切断可能な部位を有するものであり、固相上でタンパク質をフォールディングさせた後に、前記切断可能部位を切断する工程を含む、前記請求項 1 8 又は 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記スペーサーが DNA スペーサーであり、前記切断可能部位が制限酵素認識部位である、前記請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記請求項 1 ～ 2 1 のいずれかの方法によって得られるタンパク質であって、8 ～ 5 0 0 のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を 2 ～ 1 0 個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

【請求項 2 3】

8 ～ 5 0 0 のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を 2 ～ 1 0 個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。



【書類名】 明細書

【発明の名称】 有用タンパク質のスクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、ランダムな架橋を利用した有用なタンパク質のスクリーニング方法、そのスクリーニング方法によって得られるタンパク質などに関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質の構造解析から有用な機能を持つタンパク質をデザインするという発想に基づくタンパク質工学は、長年の努力にも関わらず目立った成果を挙げることが困難であった。そこで、進化の原理を応用した分子デザインの方法である「進化分子工学」（非特許文献1参照）の概念が1984年にEigenらによって提案された。これは様々な変異体集団（ライブラリー）、つまり様々な構造をもつ分子集団から、目的の機能をもった分子を選択する技術の開発を意味する。1990年代に入り「In vitro evolution（試験管内進化法）」と呼ばれる一連の研究により具体的な成果が現れ、取得された機能分子もRNA、DNA、タンパク質、ペプチドと多岐にわたっている。

【0003】

核酸（RNAとDNA）のスクリーニング法としては、In vitro selection法（非特許文献2参照）やSELEX法（非特許文献3参照）、また、ペプチド、タンパク質のスクリーニング法としては、ファージディスプレイ法（非特許文献4参照）、基板上に様々な配列のペプチドを光マスク法と光反応を用いて固相合成していくフォトリソグラフィ法（非特許文献5参照）、また、無細胞翻訳系を用いたものとしてリボソームディスプレイ法（非特許文献6参照）が知られている。

また、ピューロマイシンの特異的性質を利用したin vitro virus法（Nemoto et al., FEBS Lett. 414, 405 (1997)（非特許文献7）；Tabuchi et al., FEBS Lett. 508, 309 (2001)（非特許文献8）等参照）を用いてペプチドやタンパク質をスクリーニングする方法も開発されている（WO 01/016600号公報（特許文献1）参照）。

【0004】

ペプチドやタンパク質のスクリーニング法では、大量に効率的にスクリーニングする上で、また、様々なタンパク質が合成できる点において無細胞翻訳系を用いるリボソームディスプレイ法やIn vitro virus法が優れている。一方、タンパク合成はいわゆる液相中で行われるため、タンパク質が機能を発現するために必須なフォールディングが必ずしも容易ではない。例えば、タンパク質にシステインを多く含むペプチドやタンパク質は分子間でS-S結合を形成し、個々のタンパク質がフォールディングできない問題がある。

一方、タンパク質の機能は、専らその立体構造に依存する。すなわち、タンパク質がフォールドすることによって、ある部位が特定の構造を有し、その部位が受容体、酵素などと結合し、その受容体又は酵素を活性化又は不活性化することによって何らかの生理的機能を発現する。タンパク質の立体構造の解析は、現在盛んに行われているが、立体構造の解析は簡単なものではない。例えば、解析の対象となるタンパク質をNMRあるいはX線回折によって解析できる程度までに大量に調製することは困難である。また、X線回折に供するためには、タンパク質を結晶化することが必須であるが、この結晶化も容易ではないからである。

【0005】

【特許文献1】 WO 01/016600号公報

【非特許文献1】 Eigen, E. & Gardiner, W., Pure & Appl. Chem., 56, 967-978

【非特許文献2】 Ellington, A. D. & Szostak, J. W., Nature, 346, 818-822, (1990)

【非特許文献3】 Tuerk, C. & Gold, L., Science, 249, 505-510 (1990)

【非特許文献4】 Scott, J. K., & Smith, G. D., Science, 249, 386-390 (1990)

)

【非特許文献5】Fodor, S. P. , et al. , Science, 251, 767-773 (1991)

【非特許文献6】Mattheakis, L. C. , et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9022-9026

【非特許文献7】Nemoto et al. , FEBS Lett. 414, 405 (1997)

【非特許文献8】Tabuchi et al. , FEBS Lett. 508, 309 (2001)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

このように、現在では、多くの労力が生体内で発現するタンパク質の立体構造解析とその機能解析に注がれている。しかしながら、上述のように、立体構造解析は困難であるから、人工合成によって得られる種々の立体構造を有するタンパク質から特定の機能を有するタンパク質を効率良く、かつ容易にスクリーニングできる手法が確立されることが望ましい。

また、タンパク質のスクリーニングあるいはタンパク質の機能解析において、タンパク質のフォールディングは極めて重要であるが上述のように合成途中で分子間の相互作用が生じるために困難である。タンパク質を確実にフォールディングさせた後にスクリーニングや機能解析をする手法を確立することが望ましい。また、そのようにして取得されたタンパク質の構造を改変してより高い活性を有するタンパク質を設計する手法が確立されることが望ましい。

上記の事情に鑑み本発明者らは、人工合成によって得られる種々の立体構造を有するタンパク質から特定の機能を有するタンパク質を効率良く、かつ容易にスクリーニングできる方法の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、上記従来技術の問題を解決するためになされたもので、次に示すような、有用なタンパク質のスクリーニング方法、そのスクリーニング方法によって得られるタンパク質等を提供する。

(1) システイン残基をランダムにアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合をランダムに有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

(a) 少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピューロマイシン連結体(群)を得る工程；

(b) 工程(a)で得られたmRNA-ピューロマイシン連結体(群)と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を調製する工程；及び

(c) 工程(b)において調製されたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)と1以上の標的物質とを接触させ、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；を含む上記スクリーニング方法。

(2) 前記mRNA-ピューロマイシン連結体が、mRNAの3'末端にスペーサーを介してピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物を連結したものである前記(1)に記載の方法。

(3) 工程(a)において、前記mRNAが、2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするDNAから転写されることによって調製される、前記(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 工程(b)において用いられる翻訳系が無細胞翻訳系である、前記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 工程(c)において、前記タンパク質と前記標的物質とが相互作用しているか否

かの判定が、アフィニティーカラムクロマトグラフィー法又はアフィニティービーズ法によって両者が結合しているか否かを判断することによって行われる、前記(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 工程(c)において相互作用していると判断されたタンパク質及び／又は標的物質を同定する工程をさらに含む、前記(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 工程(c)に続いて、さらに、(d)前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含むmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)のmRNAから逆転写によりDNAを調製し、さらにそのDNAに変異を導入することによって改変された配列を有するmRNAを調製し、このmRNAを工程(a)に供することによって、標的物質との相互作用力を強化したタンパク質を取得する、前記(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 前記DNAの変異がError-Prone PCRによって行われる、前記(1)～(7)のいずれかに記載の方法。

(9) 工程(a)～(d)を複数回繰り返すことによって標的物質との相互作用力を強化したタンパク質を取得する、前記(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 前記mRNAが、8～500個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記(1)～(9)のいずれかに記載の方法。

(11) 前記mRNAが、10～200個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記(1)～(10)のいずれかに記載の方法。

(12) 前記mRNAが、4～10個のシステイン残基を有するタンパク質をコードするものである、前記(1)～(11)のいずれかに記載の方法。

(13) 前記mRNAが、隣接するシステイン残基がそれぞれ2～20個離れて存在するようにアミノ酸配列中に分散しているタンパク質をコードするものである、前記(1)～(12)のいずれかに記載の方法。

(14) 前記mRNAが、最もN末端側に位置するシステイン残基と最もC末端側に位置するシステイン残基が10～50個離れているタンパク質をコードするものである、前記(1)～(13)のいずれかに記載の方法。

(15) 前記スペーサーが、ポリヌクレオチド、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリスチレン、ペプチド核酸又はこれらの組合せを主骨格として含むものである、前記(1)～(14)のいずれかに記載の方法。

(16) 前記スペーサーは固相結合部位を有し、前記mRNA-ピューロマイシン連結体が、その固相結合部位を介して固相に結合されている、前記(1)～(15)のいずれかに記載の方法。

(17) 前記固相が、スチレンビーズ、ガラスビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、磁性体ビーズ、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板、ガラス容器、プラスチック容器及びメンブレンから選択される、前記(1)～(16)のいずれかに記載の方法。

(18) 前記スペーサーの固相結合部位は切断可能部位を有しており、工程(b)において固相上でタンパク質を確実にフォールディングさせた後に、その切断可能部位を切断してmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を固相から切り離し、そして切り離されたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を工程(c)に供する、前記(16)又は(17)に記載の方法。

(19) 前記スペーサーがDNAスペーサーであり、前記切断可能部位が制限酵素認識部位である、前記(18)に記載の方法。

(20) 前記(1)～(19)のいずれかの方法によって得られるタンパク質であって、8～500のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を2～10個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

(21) 8～500のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を2～10個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

また本発明は、より好ましくは、以下の有用なタンパク質のスクリーニング方法、および



該スクリーニング方法によって得られるタンパク質等に関する。

〔1〕 システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

(a) 少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピュロマイシン又はピュロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピュロマイシン連結体(群)を得る工程；

(b) 工程(a)で得られたmRNA-ピュロマイシン連結体(群)と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)を調製する工程；及び

(c) 工程(b)において調製されたmRNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)と1以上の標的物質とを接触させ、mRNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；

を含む上記スクリーニング方法。

〔2〕 工程(c)に続いて、さらに、(d) 前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含むmRNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)のmRNAから逆転写によりDNAを調製し、さらにそのDNAに変異を導入することによって改変された配列を有するmRNAを調製し、このmRNAを工程(a)に供することによって、標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕 システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

(a) 少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピュロマイシン又はピュロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピュロマイシン連結体(群)を得る工程；

(b) 工程(a)で得られたmRNA-ピュロマイシン連結体(群)と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)を調製する工程；

(c) 工程(b)で得られたmRNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)のmRNAから逆転写によりDNAを調製し、DNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体を調製する工程；及び

(d) 工程(c)において調製されたDNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)と1以上の標的物質とを接触させ、DNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；

を含む上記スクリーニング方法。

〔4〕 工程(d)に続いて、さらに、(e) 前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含むDNA-ピュロマイシン-タンパク質連結体(群)におけるDNAに変異を導入することによって改変された配列を有するmRNAを調製し、このmRNAを工程(a)に供することによって、標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記〔3〕に記載の方法。

〔5〕 工程(a)において、前記mRNA-ピュロマイシン連結体が、mRNAの3'末端にスペーサーを介してピュロマイシン又はピュロマイシン様化合物と連結した構造である前記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔6〕 工程(a)において、前記mRNAが、2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするDNAから転写されることによって調製される、前記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕 工程(b)において用いられる翻訳系が無細胞翻訳系である、前記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法。

〔8〕 前記タンパク質と前記標的物質とが相互作用しているか否かの判定が、アフィニティーカラムクロマトグラフィー法又はアフィニティービーズ法によって両者が結合しているか否かを判断することによって行われる、前記〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔9〕 相互作用していると判断されたタンパク質及び／又は標的物質を同定する工程をさらに含む、前記〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の方法。

〔10〕 前記DNAの変異がError-Prone PCRによって行われる、前記〔2〕、または〔4〕～〔9〕のいずれかに記載の方法。

〔11〕 前記の各工程を複数回繰り返すことによって標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の方法。

〔12〕 前記mRNAが、8～500個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記〔1〕～〔11〕のいずれかに記載の方法。

〔13〕 前記mRNAが、10～200個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記〔1〕～〔12〕のいずれかに記載の方法。

〔14〕 前記mRNAが、2～10個のシステイン残基を有するタンパク質をコードするものである、前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の方法。

〔15〕 前記mRNAが、隣接するシステイン残基がそれぞれ2～20個離れて存在するようにアミノ酸配列中に分散しているタンパク質をコードするものである、前記〔1〕～〔14〕のいずれかに記載の方法。

〔16〕 前記mRNAが、最もN末端側に位置するシステイン残基と最もC末端側に位置するシステイン残基が5～50個離れているタンパク質をコードするものである、前記〔1〕～〔15〕のいずれかに記載の方法。

〔17〕 前記スペーサーが、ポリヌクレオチド、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリスチレン、ペプチド核酸又はこれらの組合せを主骨格として含むものである、前記〔5〕～〔16〕のいずれかに記載の方法。

〔18〕 前記スペーサーは固相結合部位を有し、前記mRNA-ピューロマイシン連結体が、その固相結合部位を介して固相に結合されている、前記〔5〕～〔17〕のいずれかに記載の方法。

〔19〕 前記固相が、スチレンビーズ、ガラスビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、磁性体ビーズ、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板、ガラス容器、プラスチック容器及びメンブレンから選択される、前記〔18〕に記載の方法。

〔20〕 前記スペーサーの固相結合部位が切断可能な部位を有するものであり、固相上でタンパク質をフォールディングさせた後に、前記切断可能部位を切断する工程を含む、前記〔18〕又は〔19〕に記載の方法。

〔21〕 前記スペーサーがDNAスペーサーであり、前記切断可能部位が制限酵素認識部位である、前記〔20〕に記載の方法。

〔22〕 前記〔1〕～〔21〕のいずれかの方法によって得られるタンパク質であって、8～500のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を2～10個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

〔23〕 8～500のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を2～10個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

#### 【発明の効果】

#### 【0008】

本発明のスクリーニング方法によれば、種々の立体構造を構成する種々のタンパク質を設計し、そのタンパク質と標的物質との相互作用を容易に判定できる形態で調製し、それをスクリーニング工程に供することができるので、ある標的物質と相互作用するタンパク質を容易にスクリーニングすることができる。

また、本発明の別の態様によれば、ある標的物質と相互作用する有用タンパク質のアミ

ノ酸配列をランダムに改変して、さらにその改変されたタンパク質の活性を測定することによって、有用タンパク質のアミノ酸配列の最適化を容易に行うことができるという利点がある。このようなスクリーニング方法によって得られるタンパク質は、標的物質の生理的機能を調整する、生理活性物質として、種々の医薬用途に用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明をその実施態様に基づいて詳細に説明する。

本発明は、システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合をランダムに有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質を特定する方法に関する。

【0010】

本発明の好ましい態様においては、下記工程 (a) ~ (c) を有する、システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質を特定する方法に関する。

(a) 少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピューロマイシン連結体 (群) (以下、「mRNA-PM連結体 (群)」ともいう) を得る工程；

(b) 工程 (a) で得られたmRNA-PM連結体 (群) と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) (以下、「mRNA-PM-PRT連結体 (群)」ともいう) を調製する工程；及び

(c) 工程 (b) において調製されたmRNA-PM-PRT連結体 (群) と1以上の標的物質とを接触させ、mRNA-PM-PRT連結体 (群) 中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程。

【0011】

ここで、「システイン残基をアミノ酸配列中に導入する」とは、好ましくは、あるアミノ酸配列 (天然タンパク質由来又は合成配列) に部位無作為的 (ランダム) にシステイン残基を導入することをいう。但し本発明においては、アミノ酸配列中に導入されるシステイン残基は、必ずしもランダムに導入される場合限定されず、例えば、ある規則性に基づいて、または計画的にシステイン残基が配置されるように導入される場合も含まれる。また、「ジスルフィド結合を有するタンパク質」とは、好ましくは、そのタンパク質が部位無作為的 (ランダム) にジスルフィド結合を有することをいうが、上記のように必ずしも、ランダムにジスルフィド結合を有すること限定されない。

【0012】

以下、各工程の詳細について説明する。

1. 工程 (a) : mRNA-ピューロマイシン連結体 (群) の調製  
(mRNAの配列設計)

工程 (a) において用いられるmRNAは、取得上および取り扱い上の便宜から、人工的に調製されるものが好ましいが、自然界に存在するものを排除するものではない。ここで用いられるmRNAは、少なくとも1以上のジスルフィド結合を有するタンパク質を合成するために、少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードしている。このmRNAは、好ましくは、2~10個、より好ましくは4~10個のシステイン残基を有するタンパク質をコードする。本明細書中、「タンパク質」という用語はペプチドを含むものと解される。なお、翻訳によって合成されるタンパク質中のシステイン残基が、ジスルフィド結合を形成するためには、好ましくは、少なくとも2個以上のシステイン残基が、それぞれ、2アミノ酸残基以上、より好ましくは3アミノ酸残基以上離れていることが望まれる。また、システイン残基は、アミノ酸配列中にある程度分散していることが好ましく、N末端側あるいはC末端側に偏在しているものよりは、そうでない配列のほうが好ましい。また、最もN末端側に位置するシステイン残基と最もC末端側に位置するシステイン残基が、好まし



くは5~50個、より好ましくは10~50個離れているタンパク質をコードするmRNAであることが望ましい。

#### 【0013】

本発明において用いられるmRNAとしては、特にこれに限定されないが、好ましくは、10~200、より好ましくは10~100、さらに好ましくは15~50、さらに好ましくは20~40個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものが挙げられる。あまりに長いものは調製が困難であるし、あまりに短いものは合成されるタンパク質が適当な立体構造をとりにくいからである。

尚、アミノ酸の種類は必ずしも20種類全てを含む必要はない。

#### 【0014】

本発明で用いられるmRNAは、上記のような条件を考慮して、適宜設計される。なお、上記のような条件を満たす配列は、人為的にも容易に設計できるし、簡単なコンピュータプログラムによっても容易に設計することができる。本発明においては、これらに限定されるものではないが、例えば、アミノ酸残基を30個有し、システインを6個有するタンパク質をターゲットとした場合は、例えば、下記のアミノ酸配列（式中、S1~S6はシステイン残基を示し、A1~A30はシステイン残基以外のアミノ酸残基（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、リシン、アルギニン又はヒスチジン）を有するタンパク質をコードするmRNAが用いられる。

#### 【0015】

- (1) A1-A2-S1-A4-A5-A6-S2-A8-A9-A10-S3-A12-A13-A14-S4-A16-A17-A18-S5-A20-A21-A22-S6-A24-A25-A26-A27-A28-A29-A30;
- (2) A1-A2-A3-S1-A5-A6-A7-S2-A9-A10-A11-S3-A13-A14-A15-S4-A17-A18-A19-S5-A21-A22-A23-S6-A25-A26-A27-A28-A29-A30;
- (3) A1-S1-A3-A4-A5-A6-S2-A8-A9-A10-A11-S3-A13-A14-A15-A16-S4-A18-A19-A20-A21-S5-A23-A24-A25-A26-S6-A28-A29-A30;
- (4) A1-S1-A3-A4-A5-A6-A7-S2-A9-A10-A11-A12-A13-S3-A15-A16-A17-A18-A19-S4-A21-A22-A23-A24-S5-A26-A27-A28-S6-A30;
- (5) A1-A2-S1-A4-A5-S2-A7-A8-A9-A10-A11-A12-A13-S3-A15-S4-A17-A18-A19-A20-A21-A22-A23-A24-S5-A26-A27-S6-A29-A30;
- (6) A1-A2-A3-A4-A5-S1-A7-A8-S2-A10-A11-A12-A13-A14-A15-S3-A17-S4-A19-A20-A21-S5-A23-A24-A25-S6-A27-S6-A29-A30;
- (7) A1-A2-A3-S1-A5-A6-A7-A8-A9-A10-A11-S2-A13-A14-A15-S3-A17-A18-A19-A20-A21-S4-A23-A24-A25-S5-A27-A28-S6-A30;
- (8) A1-S1-A3-S2-A5-A6-A7-A8-A9-S3-A11-A12-S4-A14-A15-A16-A17-A18-A19-A20-A21-A22-A23-S5-A25-A26-A27-S6-A29-A30;
- (9) A1-A2-A3-A4-A5-A6-S1-A8-A9-A10-S2-A12-A13-S3-A15-A16-A17-A18-A19-A20-S4-A22-A23-A24-A25-A26-S5-A28-S6-A30; 又は
- (10) A1-S1-A3-A4-A5-A6-S2-A8-S3-A10-S4-A12-A13-A14-A15-A16-A17-S5-A19-A20-A21-A22-A23-A24-S6-A26-A27-A28-A29-A30。

#### 【0016】

なお、既に公知のアミノ酸配列あるいは核酸配列から、上記条件を満たす配列を検索し、これに基づいて所望の核酸配列を設計することもできる。このような公知のアミノ酸配列又は核酸配列情報は、公知のデータベース、例えば、PDB（プロテインデータバンク）、GenBank（National Center for Biotechnology Information）、EMBL（European Bioinformatics Institute, EBI）、DDBJ（国立遺伝学研究所）等から入手可能である。

#### 【0017】

また、タンパク質の立体構造の形成には、ジスルフィド結合以外にも、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力などの種々の要素が関与している。また、 $\alpha$ -ヘリックス



、 $\beta$ -シート、ジंकフィンガー、ロイシンジッパー、ヘリックスターンヘリックス、ヘリックスループヘリックス等を形成するアミノ酸配列も当業者には公知である。したがって、必要に応じてこれらの要素も考慮し、公知のコンピューター・アシステッド・モレキュラー・デザインの手法を用いて、より適切な配列を設計することもできる。例えば、 $\beta$ -シート構造を3つほど有すると、それらの $\beta$ -シート構造間で水素結合を形成することが知られており、このような情報は、システイン残基によるS-S結合以外の立体構造形成のための情報として有用である。そのような配列設計のための有用な情報として下記文献が参考となる。

- (1) Nielsen, KJ, et al. J. Mol. Recognit. , 2000 ; 13 : 55-70
- (2) Norton, RS, & Pallaghy, Toxicon, 1998 ; 36 : 1573-1583.
- (3) Kim JII, et al. , J. Mol. Biol. 1995 ; 250 : 659-671
- (4) Goldenberg, DP. , et al. , Protein Science, 2001 ; 10 : 538-550.
- (5) Miles, LA. , et al. , J. Biol. Chem. , 2002 ; 277 : 43033-43040.

#### 【0018】

(mRNAの調製)

本発明で用いられるmRNAは、上記のようにしてそれがコードすべきアミノ酸配列を設計すれば、後は公知の核酸合成手法に基づいて合成することができる (perSeptive Biosystems, DNA/RNA Synthesis System, 1995)。また、このようなmRNAは、上記のようにして設計したアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAを合成し、そのDNAを転写反応に供することによって容易に調製することができる (Krupp G & Soll D, FEBS Lett. 1987, 212, 271-275.)。

また、本発明の好ましい態様によれば、上記の設計方法に基づき、DNA合成機によって、所望のタンパク質群をコードするDNAライブラリーを作成し、このDNAライブラリーから転写されるmRNAを用いることができる。

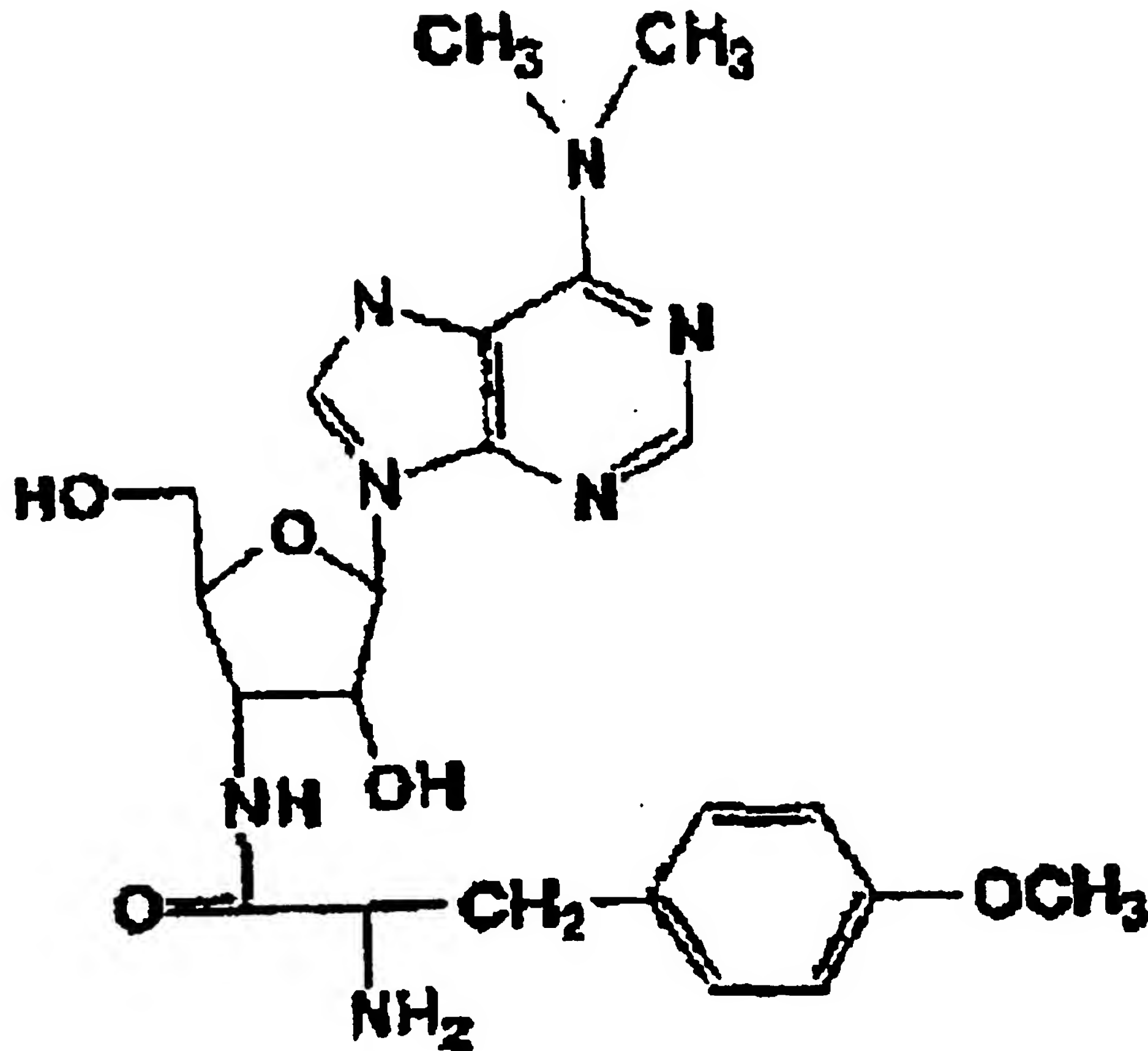
#### 【0019】

(ピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物)

上記のようにして得られるmRNAを、通常、mRNAの3'末端にスパーサーを介してピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物を連結して、mRNA-PM連結体を調製する。ここで、ピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物は、mRNA-PM連結体を翻訳系に投入してタンパク質を合成する際に、mRNAと翻訳されたタンパク質とを連結するヒンジあるいは連結部の役割をする。すなわち、mRNAにスパーサーを介してピューロマイシンを結合したものと翻訳系を接触させると、そのmRNAがピューロマイシンを介して翻訳されたタンパク質と結合したIn vitro virusビリオンが生成することが知られている (Nemoto et al. , FEBS Lett. 414, 405 (1997) 参照)。ピューロマイシン (Puromycin) は、その3'末端がアミノアシルtRNAに化学構造骨格が類似している、下記式 (I) :

#### 【0020】

【化1】



( I )

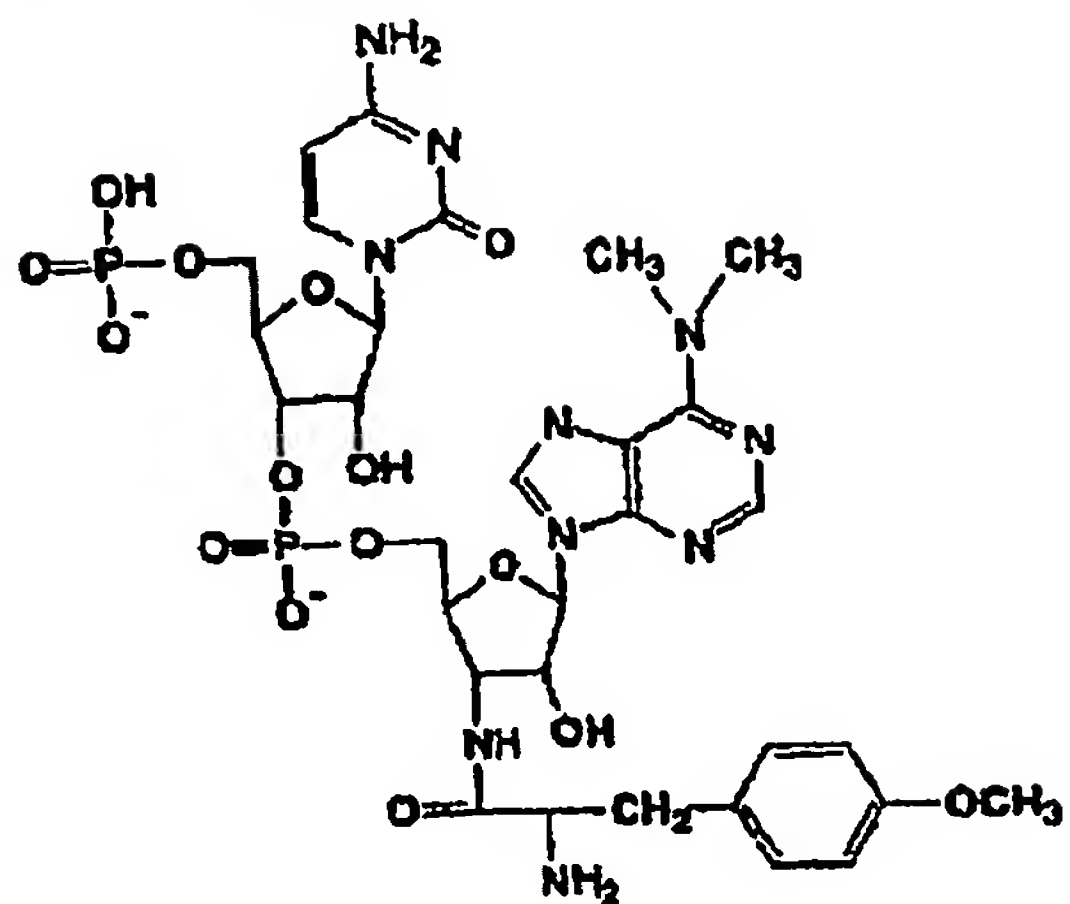
に示される化合物で、翻訳系でタンパク質の合成が行われた際に、合成されたタンパク質のC末端に結合する能力を有する。本明細書中、「ピューロマイシン様化合物」とは、その3'末端がアミノアシルtRNAに化学構造骨格が類似し、翻訳系でタンパク質の合成が行われた際に、合成されたタンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物をいう。

【0021】

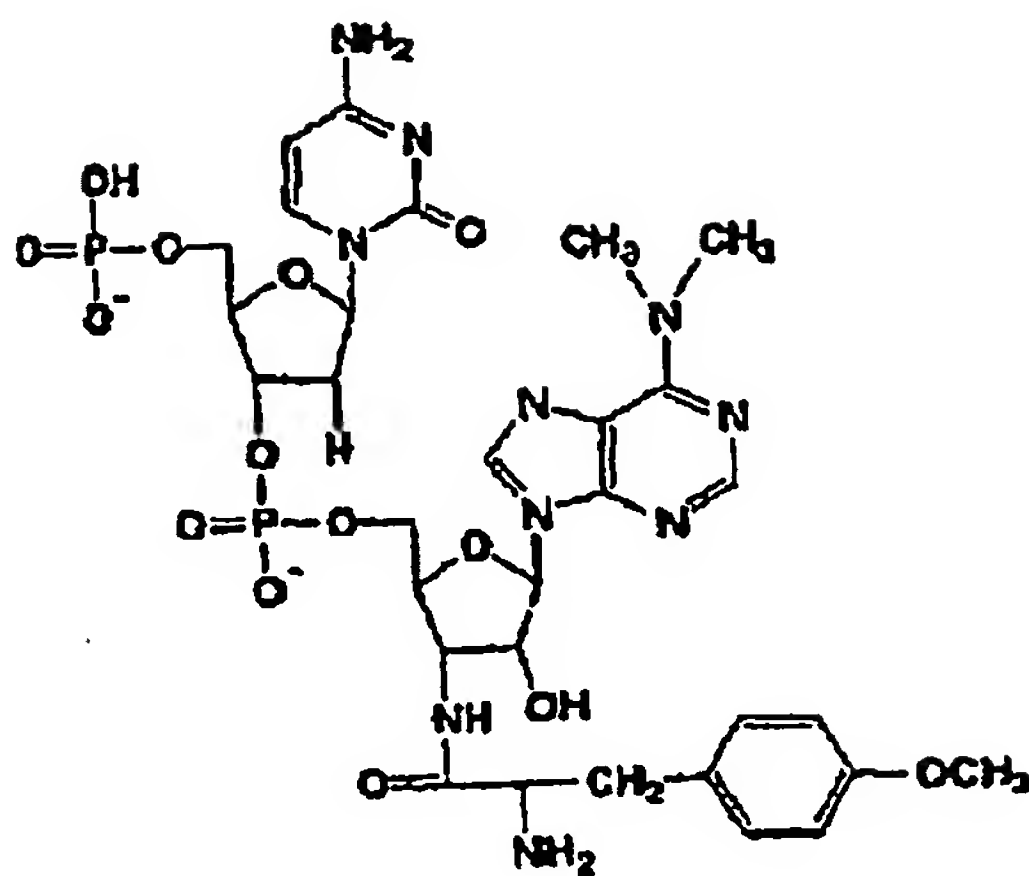
ピューロマイシン様化合物としては、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド (3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside, PANS-アミノ酸)、例えば、アミノ酸部がグリシンのPANS-Gly、アミノ酸部がバリンのPANS-Val、アミノ酸部がアラニンのPANS-Ala、その他、アミノ酸部が全ての各アミノ酸に対応するPANS-アミノ酸化合物が挙げられる。また、3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合して形成されるアミド結合で連結した3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド (3'-Aminoacyladenine aminonucleoside, AANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンのAANS-Gly、アミノ酸部がバリンのAANS-Val、アミノ酸部がアラニンのAANS-Ala、その他、アミノ酸部が全アミノ酸の各アミノ酸に対応するAANS-アミノ酸化合物を使用できる。また、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドとアミノ酸のエステル結合したものなども使用できる。なお、上記ピューロマイシン以外に好ましく用いられるピューロマイシン様化合物は、リボシチジルピューロマイシン (rCpPur)、デオキシチジルピューロマイシン (dCpPur)、デオキシウリジルピューロマイシン (dUpPur) などであり、下記にその化学構造式を示す。

【0022】

【化2】



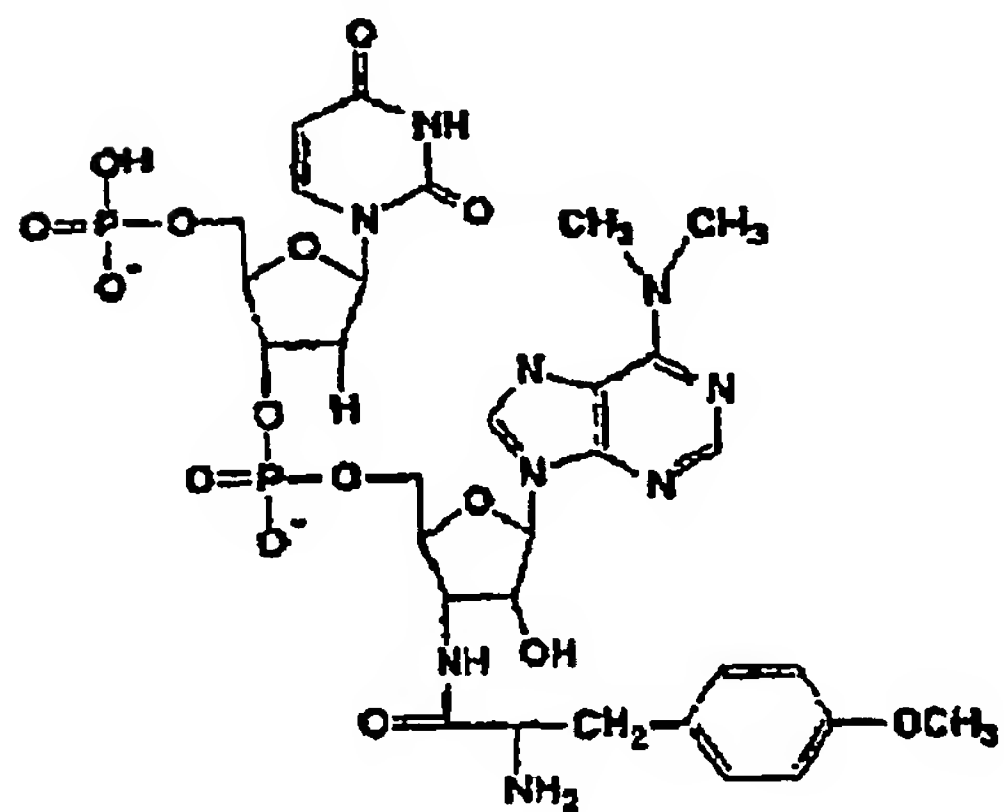
rCpPur



dCpPur

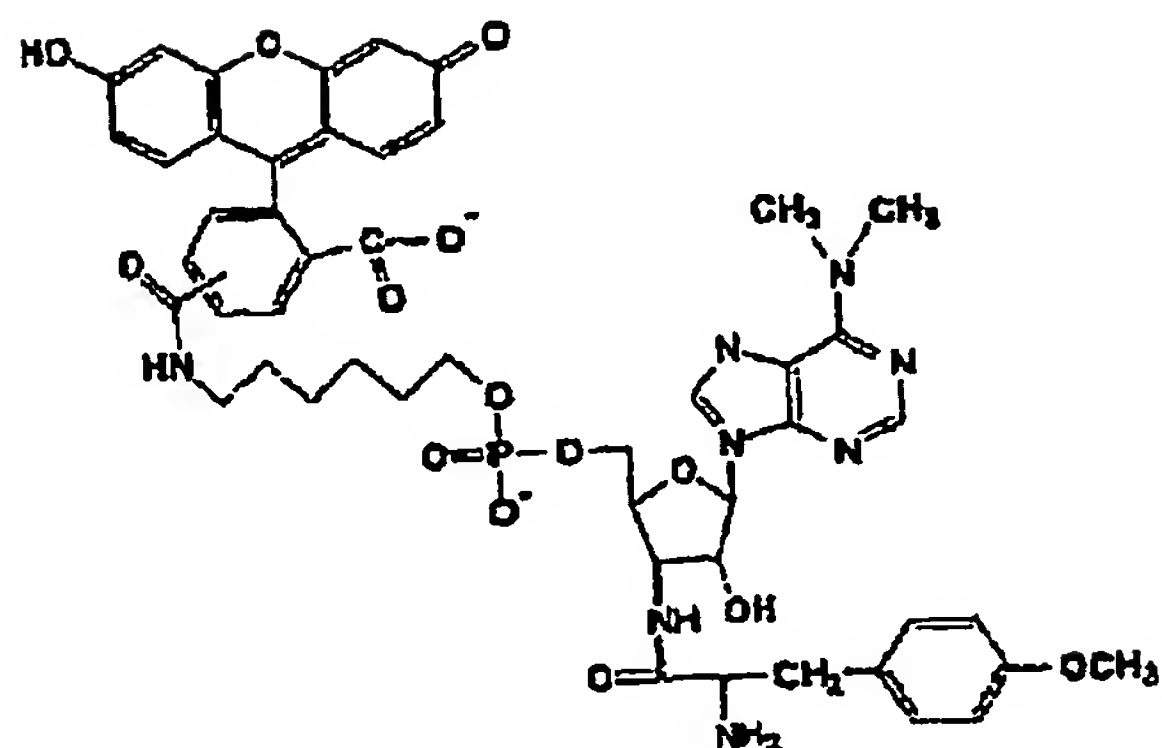
【0023】

【化3】



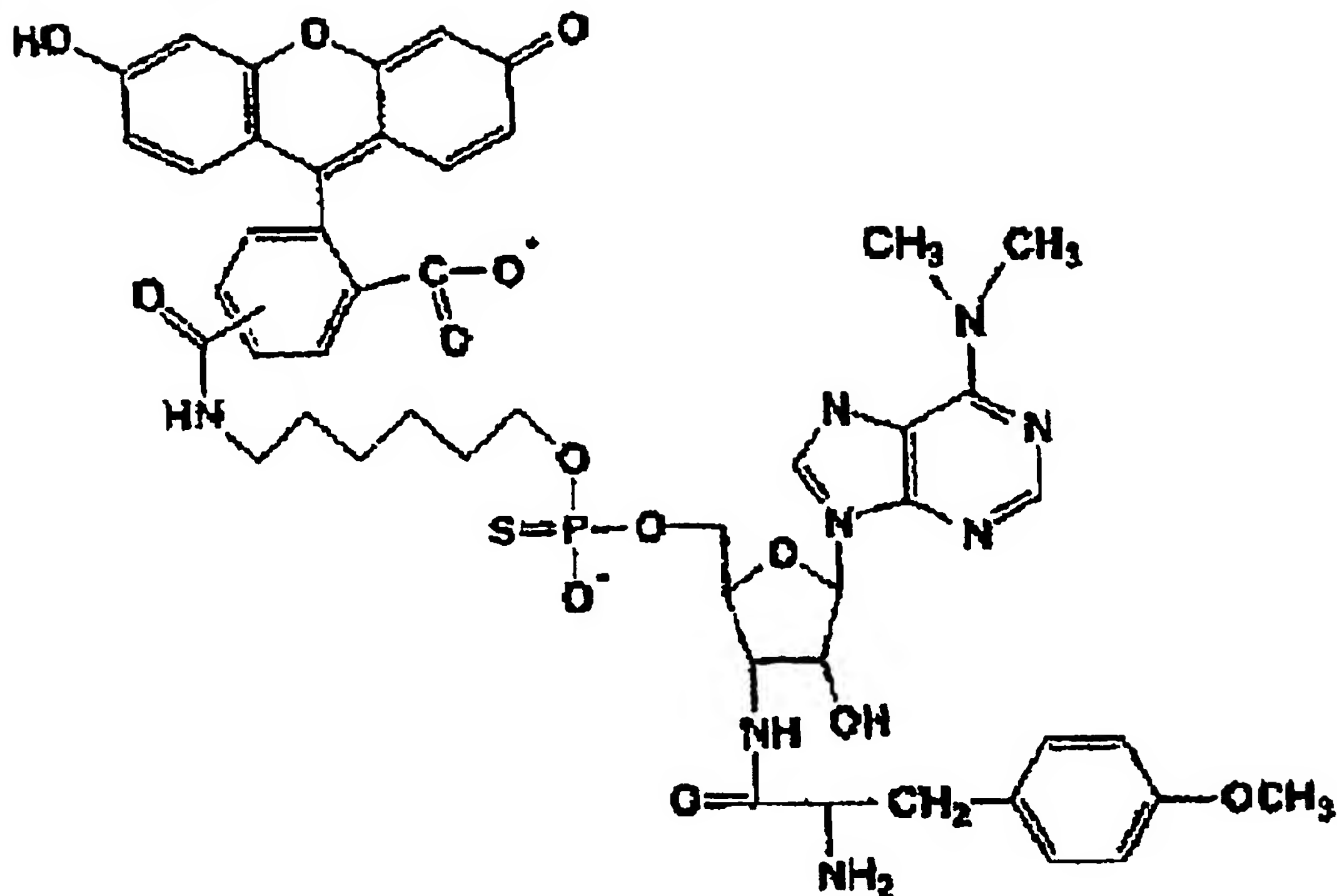
dUpPur

【0024】



Fluoropur

【化4】



## Lurothiopur

### 【0025】

(スペーサー)

本発明のmRNA-PM連結体においては、mRNAとピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物（以下、単に「ピューロマイシン」と称する）は、スペーサーを介して連結される。また、この連結体は、好ましくは、このスペーサーに設けられた固相結合部位を介して固相に固定化される。スペーサーは、主として、ピューロマイシンをリボソームのAサイトと呼ばれる部位に効率良く取り込ませるために用いられる。従って、スペーサーとしては、そのような性質を有する限り特に限定されないが、柔軟性があり、親水性で、側鎖の少ない単純な構造を有する骨格を有するものが好ましい。具体的には、ここで用いられるスペーサーとして、これらに限定されないが、ポリヌクレオチド（DNA含む）、ポリエチレンなどのポリアルキレン、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、ペプチド核酸（PNA）、ポリスチレン等の直鎖状物質又はこれらの組合せを主骨格として含むものが好ましく用いられる。上記直鎖上物質を組み合わせる際は、適宜、それらを適当な連結基（-NH-、-CO-、-O-、-NHCO-、-CONH-、-NHNH-、 $-(CH_2)_n$ -[nは例えば1~10、好ましくは1~3]、-S-、-SO-など）で化学的に連結することができる。

### 【0026】

mRNAとスペーサーとの連結は、公知の手法を用いて直接的又は間接的に、化学的又は物理的に行うことができる。例えば、DNAをスペーサーとして用いる場合は、mRNAの3'末端にそのDNAスペーサーの末端と相補的な配列を設けておくことにより、両者を連結することができる。また、スペーサーとピューロマイシンを連結する場合は、通常、公知の化学的手法によって連結される。

### 【0027】

なお、タンパク質を合成した後に、mRNA-PM-タンパク質の複合体を固相から切り離す必要がある場合は、スペーサー中に切断可能部位を設けると好ましい。DNAをスペーサーの一部に用いた場合は、そのような切断可能部位として、DNA鎖中に制限酵素認識部位を



設けることができる。このような制限酵素認識部位をもつスパーサーを用いた場合は、タンパク質合成後など所望の時に、制限酵素（例えば、Alu I、BamH I、EcoR I、Hind II、Hind III、Pvu IIなど）を投入することによって、mRNA-PM-タンパク質の複合体を固相から切り離すことができる。制限酵素認識部位とその部位を切断する酵素の組合せは公知である（New England BioLabs 2000・01 Catalog & Technical reference等参照）。

#### 【0028】

なお、本発明のmRNA-PM連結体には、必要に応じて標識物質を結合させることによって標識することができる。そのような標識物質は、蛍光性物質、放射性標識物質などから適宜選択される。蛍光物質としては、フリーの官能基（例えば活性エステルに変換可能なカルボキシル基、ホスホアミダイドに変換可能な水酸基、あるいはアミノ基など）を持ち、スパーサー又はピュロマイシン又はピュロマイシン様化合物に連結可能な種々の蛍光色素を用いることができる。適当な標識物質としては、例えばフルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質； $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 若しくは $^{131}\text{I}$ 等の放射性同位体などが挙げられる。

#### 【0029】

（固相）

mRNA-PM連結体が固定される固相は特に限定されず、その連結体を使用される目的に応じて適宜選択される。本発明で用いられる固相としては、生体分子を固定する担体となるものを用いることができ、例えば、スチレンビーズ、ガラスビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、磁性体ビーズ等のビーズ；ガラス基板、シリコン（石英）基板、プラスチック基板、金属基板（例えば、金箔基板）等の基板；ガラス容器、プラスチック容器等の容器；ニトロセルロース、ポリビニリデンフルオリド（PVDF）等の材料からなるメンブレンなどが挙げられる。

#### 【0030】

本発明のmRNA-PM連結体を固相に固定する場合は、mRNAが翻訳系と接触する際に、その翻訳の障害とならないように固定すればよく、その固定化手段は特に限定されない。通常は、mRNAとPMを連結するスパーサーに固相結合部位を設け、その固相結合部位を、固相に結合させた「固相結合部位認識部位」を介して、mRNA-PM連結体を固相に固定する。固相結合部位は、mRNA-PM連結体を所望の固相に結合し得るものであれば特に限定されない。例えば、このような固相結合部位として、特定のポリペプチドに特異的に結合する分子（例えば、リガンド、抗体など）が用いられ、この場合は、固相表面には固相結合部位認識部位として、その分子と結合する特定のポリペプチドを結合させておく。固相結合部位／固相結合部位認識部位の組合せの例としては、例えば、アビジン及びストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質／ビオチン、マルトース結合タンパク質／マルトース、Gタンパク質／グアニンヌクレオチド、ポリヒスチジンペプチド／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ／グルタチオン、DNA結合タンパク質／DNA、抗体／抗原分子（エピトープ）、カルモジュリン／カルモジュリン結合ペプチド、ATP結合タンパク質／ATP、あるいはエストラジオール受容体タンパク質／エストラジオールなどの、各種受容体タンパク質／そのリガンドなどが挙げられる。これらの中で、固相結合部位／固相結合部位認識部位の組合せとしては、アビジン及びストレプトアビジンなどのビオチン結合タンパク質、マルトース結合タンパク質／マルトース、ポリヒスチジンペプチド／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ／グルタチオン、抗体／抗原分子（エピトープ）などが好ましく、特にストレプトアビジン／ビオチンの組合せが最も好ましい。

#### 【0031】

上記タンパク質の固相表面への結合は、公知の方法を用いることができる。そのような公知の方法としては、例えば、タンニン酸、ホルマリン、グルタルアルデヒド、ピルビクアルデヒド、ビス-ジアゾ化ベンジゾン、トルエン-2, 4-ジイソシアネート、カルボキシル基、又は水酸基あるいはアミノ基などを利用する方法を挙げることができる（P. M.

Abdella, P. K. Smith, G. P. Royer, A New Cleavable Reagent for Cross-Linking and Reversible Immobilization of Proteins, Biochem. Biophys. Res. Commun. , 87, 734 (1979) 等参照)。

#### 【0032】

なお、上記組合せは、固相結合部位と固相結合部位認識部位とを逆転させて用いることもできる。上記の固定化手段は、2つの相互に親和性を有する物質を利用した固定化方法であるが、固相がスチレンビーズ、スチレン基板などのプラスチック材料であれば、必要に応じて、公知の手法を用いてスパーサーの一部を直接それらの固相に共有結合させることもできる (Qiagen社、LiquiChip Applications Handbook等参照)。なお、本発明においては、固定手段については上記の方法に限定されることなく、当業者に公知である如何なる固定手段をも利用することができる。

#### 【0033】

### 2. 工程 (b) : mRNA-PM-PRT連結体 (群) の調製

工程 (b) では、mRNA-PM連結体を翻訳系と接触させることによって、タンパク質の合成を行い、mRNA-PM-PRT連結体 (群) を調製する。ここで用いることができる翻訳系としては、無細胞翻訳系又は生細胞などが挙げられる。無細胞翻訳系としては、原核又は真核生物の抽出物により構成される無細胞翻訳系、例えば大腸菌、ウサギ網状赤血球、小麦胚芽抽出物などが使用できる (Lamfrom H, Grunberg-Manago M. Ambiguities of translation of poly U in the rabbit reticulocyte system. Biochem Biophys Res Commun. 1967 27 (1) : 1-6等参照)。生細胞翻訳系としては、原核又は真核生物、例えば大腸菌の細胞などが使用できる。本発明においては、取り扱いの容易さから、無細胞系を使用することが好ましい。

#### 【0034】

さらに必要に応じて、ジスルフィド結合を形成させるために、得られたmRNA-PM-PRT連結体 (群) を酸化還元処理に供する。例えば、得られたmRNA-PM-PRT連結体 (群) をジチオスレイトール (DTT) などの還元剤の存在下、0~35℃で、0.5~3時間反応させて還元する。次に、このように処理されたmRNA-PM-PRT連結体 (群) をo-ヨードソ安息香酸等の酸化剤の存在下、適当なバッファー (例えばpH.7の50mMリン酸バッファー) 中、0~35℃で、5分~1時間反応させる。必要に応じて各処理後、適当な洗浄用バッファー (例えば、Washing Buffer (Tris-HCl pH.8.0, NaCl 100mM) で洗浄する。

#### 【0035】

なお、本発明の好ましい態様によれば、前記スパーサーの固相結合部位は切断可能部位を有しており、工程 (b) においては、固相上でタンパク質を確実にフォールディングさせた後に、その切断可能部位を切断してmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) を固相から切り離し、そして切り離されたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) を工程 (c) に供するようにする。このような操作をすることにより、タンパク質を確実にフォールディングさせた後にスクリーニングや機能解析をすることができる。

#### 【0036】

### 3. 工程 (c) : タンパク質と標的物質との相互作用の測定

上記工程 (c) においては、工程 (b) において調製されたmRNA-PM-PRT連結体 (群) と1以上の標的物質とを接触させる。ここで用いられる「標的物質」とは、本発明において合成されるタンパク質と相互作用するか否かを調べるための物質を意味し、具体的にはタンパク質、核酸、糖鎖、低分子化合物などが挙げられる。

#### 【0037】

タンパク質としては、特に制限はなく、タンパク質の全長であっても結合活性部位を含む部分ペプチドでもよい。またアミノ酸配列、及びその機能が既知のタンパク質でも、未知のタンパク質でもよい。これらは、合成されたペプチド鎖、生体より精製されたタンパク質、あるいはcDNAライブラリー等から適当な翻訳系を用いて翻訳し、精製したタンパク質等でも標的分子として用いることができる。合成されたペプチド鎖はこれに糖鎖が結合した糖タンパク質であってもよい。これらのうち好ましくはアミノ酸配列が既知の精製さ



れたタンパク質か、あるいはcDNAライブラリー等から適当な方法を用いて翻訳、精製されたタンパク質を用いることができる。

核酸としては、特に制限されることはなく、DNAあるいはRNAも用いることができる。また、塩基配列あるいは機能が既知の核酸でも、未知の核酸でもよい。好ましくは、タンパク質に結合能力を有する核酸としての機能、及び塩基配列が既知のものか、あるいはゲノムライブラリー等から制限酵素等を用いて切断単離してきたものを用いることができる。

糖鎖としては、特に制限はなく、その糖配列あるいは機能が、既知の糖鎖でも未知の糖鎖でもよい。好ましくは、既に分離解析され、糖配列あるいは機能が既知の糖鎖が用いられる。

低分子化合物としては、特に制限されず、機能が未知のものでも、あるいはタンパク質に結合する能力が既に知られているものでも用いることができる。

#### 【0038】

なお、これら標的物質とタンパク質との「相互作用」とは、通常は、タンパク質と標的分子間の共有結合、疎水結合、水素結合、ファンデルワールス結合、及び静電力による結合のうち少なくとも1つから生じる分子間に働く力による作用を示すが、この用語は最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。共有結合としては、配位結合、双極子結合を含有する。また静電力による結合とは、静電結合の他、電気的反発も含有する。また、上記作用の結果生じる結合反応、合成反応、分解反応も相互作用に含有される。相互作用の具体例としては、抗原と抗体間の結合及び解離、タンパク質レセプターとリガンドの間の結合及び解離、接着分子と相手方分子の間の結合及び解離、酵素と基質の間の結合及び解離、核酸とそれに結合するタンパク質の間の結合及び解離、情報伝達系におけるタンパク質同士の間の結合と解離、糖タンパク質とタンパク質との間の結合及び解離、あるいは糖鎖とタンパク質との間の結合及び解離が挙げられる。したがって、相互作用力は、2つの物質の結合の程度（結合定数）及び／または解離の程度（解離定数）を測定することによって判断することができる。（LeTilly V. & Royer CA, Biochemistry. 1993, 32, 7753-7758）。なお、本明細書中、「酸化還元により標的物質との結合定数が変化する」とは、通常、数値が1桁以上（例えば、 $10^9$ が $10^8$ ）変化することをいう。

#### 【0039】

ここで用いられる標的物質は、必要に応じて標識物質により標識して用いることができる。必要に応じて標識物質を結合させることによって標識することができる。そのような標識物質は、蛍光性物質、放射性標識物質などから適宜選択される。蛍光物質としては、フリーの官能基（例えば活性エステルに変換可能なカルボキシル基、ホスホアミダイドに変換可能な水酸基、あるいはアミノ基など）を持ち、標的物質に連結可能な種々の蛍光色素を用いることができる。適当な標識物質としては、例えばフルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質； $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 若しくは $^{131}\text{I}$ 等の放射性同位体などが挙げられる。これらの標識物質は、標的物質と固定化タンパク質との間の相互作用に基づいて発生される信号の変化の測定又は解析方法に適したものが適宜用いられる。上記標識物質の標的物質への結合は、公知の手法に基づいて行うことができる。

#### 【0040】

工程(c)において、該タンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを測定する。該タンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かの測定は、両分子間の相互作用に基づいて発生される信号の変化を測定、検出することにより行う。そのような測定手法としては、例えば、表面プラズモン共鳴法（Cullen, D. C., et al., Biosensors, 3 (4), 211-225 (1987-88)）、エバネッセント場分子イメージング法（Funatsu, T., et al., Nature, 374, 555-559 (1995)）、蛍光イメージングアナライズ法、固相酵素免疫検定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : Crowther, J. R., Methods in Molecular Biology, 42 (1995)）、蛍光偏光解消法（Perran, J., et al., J. Phys. Rad

., 1, 390-401 (1926) )、及び蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) : Eigen, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5740-5747 (1994) ) 等が挙げられる。

#### 【0041】

また、両分子間の相互作用は、単純に、両分子が結合するか否かを判定することによって行うことができ、両分子の特異的親和性を利用した方法（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）によってそのような結合実験を行うことができる。具体的には、セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のような不溶性担体上（例えばビーズ、フィルター、メンブレン等の担体）に標的物質を常法により固定化（物理的吸着、架橋による高分子化、マトリックス中への封印あるいは非共有結合等による固定化）し、該不溶性担体をガラス製、プラスチック製あるいはステンレス製等のカラムに充填し、該カラム（例えば、円柱状カラム）に、試料を通して溶出させることにより、該試料中に含まれる、標的物質に結合する mRNA-PM-PRT 連結体を分離することができる。またこのような操作を行なうことによって、標的物質に結合しなかったタンパク質を本スクリーニングプロセスから排除することができ、必要なタンパク質のみを選別することができる。あるいは、両分子の特異的親和性を利用した方法としてアフィニティービーズ法によって結合実験を行うことができる（文献, Ogata Y, et al., Anal Chem. 2002; 74: 4702-4708）。具体的にはストレプトアビジンを表面に結合させた磁性体ビーズまたは標的分子をアミノ基などを介して表面に固定した磁性体ビーズを用いる。ビオチン化した標的分子に結合する mRNA-PM-PRT 連結体はストレプトアビジンビーズと接触させた後、磁石でストレプトアビジン磁性体ビーズを回収することによって分離することができる。また、標的分子を表面に固定した磁性体ビーズと mRNA-PM-PRT 連結体とを接触させた後に磁石で磁性体ビーズを回収することによって分離することができる。他にも、ビーズが磁性体でなく、アガロースビーズ等の場合は、磁石の代わりに遠心機を用いてビーズのみ沈殿させて回収することで分離することが可能である。

#### 【0042】

本発明の方法においては、必要に応じて、さらに、工程 (c) において相互作用していると判断されたタンパク質-標的物質結合体中の、タンパク質及び／又は標的物質を同定する。タンパク質の同定は、通常のアミノ酸配列シーケンサーで行うこともできるし、該タンパク質に結合している mRNA から DNA を逆転写し、得られた DNA の塩基配列を解析することによって行うこともできる。標的物質の同定は、NMR、IR、各種質量分析などによって行うことができる。

#### 【0043】

#### 4. 工程 (d) : 改変されたタンパク質の調製

本発明においては、好ましくは、工程 (c) に続いて、さらに、(d) 前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含む mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) の mRNA から逆転写により DNA を調製し、さらにその DNA に変異を導入することによって改変された配列を有する mRNA を調製し、この mRNA を工程 (a) に供し、次いで上述のように工程 (b) 及び (c) の処理を行うことによって、標的物質との相互作用力を強化したタンパク質を取得することができる。ここで、前記 DNA の変異は、Error-Prone PCR 法 (Gram H, et al, Proc Natl Acad Sci USA. 1992, 89, 3576-80.)、DNA Shuffling 法 (Stemmer WP, Nature. 1994, 370, 389-391) 等の公知の方法によって行うことができる。本発明においては、DNA にランダムに低確率で変異を導入することができる、Error-Prone PCR 法が好ましい。なお、Error-Prone PCR 法のキットは、Stratagene 社から GeneMorph PCT Mutagenesis Kit (GeneMorph は商標) として市販されている。このような方法を利用すると、上記工程 (a) ~ (c) において、ある標的物質に対して少しでも相互作用するタンパク質を取得できた場合に、そのタンパク質のアミノ酸配列をランダムに改変して、より活性の強いタンパク質を取得することができる。したがって、上記工程 (a) ~ (d) を複数回繰り返すことによって標的物質との相互作用力をより強化したタンパク質を取得すること



ができる。

#### 【0044】

また、このような工程を複数回（例えば、2～10回、好ましくは4～8回）繰り返すことによって、ある特定の標的物質と相互作用するタンパク質が複数取得できた場合は、それら複数タンパク質のアミノ酸配列のコンセンサス配列情報等に基づいて新たなアミノ酸配列を有するタンパク質を設計し、これを前記工程（a）に供することによって、さらに高い活性を有するタンパク質を取得することが可能となる。

#### 【0045】

このようにして得られたタンパク質は、公知の有機合成手法に基づいて有機合成することができる（泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）（1975年）等参照）。なお、このようなスクリーニング方法によって得られるタンパク質は、標的物質の生理的機能を調整する、生理活性物質として、種々の医薬用途に用いることができる。

#### 【0046】

また上記工程（c）においては、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）と標的物質とを接触させるが、本発明においては、該mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）かのmRNAから逆転写によりDNAを調製し、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）を調製した後、該連結体（群）を標的物質と接触させてもよい。

通常、DNA分子はRNA分子より安定であることが知られている。また、DNA分子は、RNA分子と比べてアルカリに強いいため、例えば、架橋反応に供する場合、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体は、より化学反応を行い易い利点を有する。

#### 【0047】

また、本発明においては、本発明の上記工程によって調製されるDNA/mRNA-ピューロマイシン-連結体（群）を、一旦保存した後に、適宜、保存された該連結体を標的分子との接触に供することも可能である。通常、DNA分子は、凍結、融解を繰り返しても安定であるが、RNA分子は、凍結、融解を繰り返すことにより通常、分解され易いことが知られている。さらに、RNA分子はDNA分子と比べて非特異的な相互作用の影響が大きいことが知られており、従って、本発明において、標的分子との接触に供する連結体は、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）であることが好ましい。

#### 【0048】

即ち、本発明の好ましい態様においては、以下の工程（a）～（d）を含む、システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法に関する。

（a）少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピューロマイシン連結体（群）を得る工程

（b）工程（a）で得られたmRNA-ピューロマイシン連結体（群）と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）を調製する工程

（c）工程（b）で得られたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）のmRNAから逆転写によりDNAを調製し、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体を調製する工程

（d）工程（c）において調製されたDNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）と1以上の標的物質とを接触させ、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程

#### 【実施例】

#### 【0049】

以下、本発明を実施例に基づいてより具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

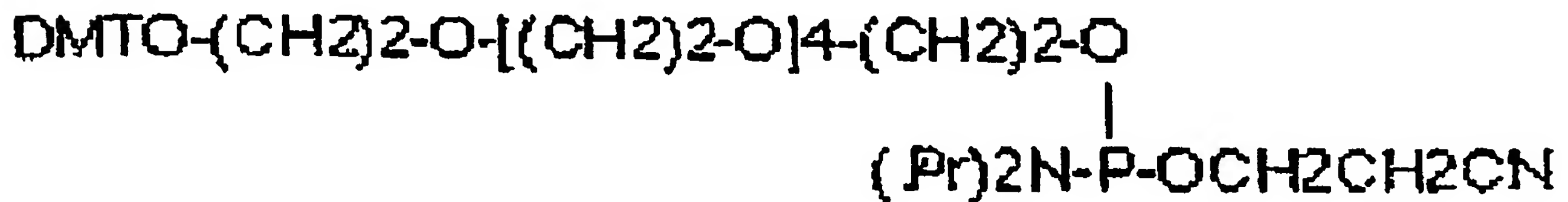
#### 実験例 1

## 1. スペーサー-BioLoop-Puro (以下"PM付きスペーサー-DNA"と略す) の合成

Puro-F-S [配列; 5'-(S)-TC(F)-(Spec18)-(Spec18)-(Spec18)-(Spec18)-CC-(Puro)-3'、BEX社より購入] 10nmolを、100 $\mu$ lの50mMリン酸バッファー (pH7.0) に溶かし、100mM TCEPを1 $\mu$ l加え (final 1mM)、室温で6時間放置し、Puro-F-S のThiolを還元する。架橋反応を行う直前に50mMリン酸バッファー (pH7.0) で平衡化したNAP5 (アマシャム、17-0853-02) を用いてTCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) を除く。なお、Puro-F-S の配列中、(S) は5'-Thiol-Modifier C6、(Puro) はPuromycin CPG、Spacer18はGlen Research Search社製のスペーサー (18-0-Dimethoxytritylhexaethyleneglycol, 1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite) で次の化学構造を有する。

【 0 0 5 0 】

【化5】



【 0 0 5 1 】

0.2Mリン酸バッファー (pH7.0) 100  $\mu$ lに、500pmol/ $\mu$ l Biotin-loop [(56mer) 配列; 5'-CCCGG TGCAG CTGTT TCATC (T-B) CGGA AACAG CTGCA CCCCC CGCCG CCCCC CG(T)CCT-3' (配列番号1、BEX社より購入), (T):Amino-Modifier C6 dT, (T-B):Biotin-dT (アンダーラインは制限酵素PvuIIのサイトを示す)] 20  $\mu$ l、100mM 架橋剤EMCS (344-05051; 6-Maleimidohehexanoic acid N-hydroxysuccinide ester)、Dojindo社製) 20  $\mu$ l、を加え、良く攪拌した後、37℃で30分放置した後に、未反応のEMCSを取り除く。沈殿を減圧下で乾燥させた後、0.2Mリン酸バッファー (pH7.0) 10  $\mu$ lに溶かし、上記の還元したPuro-F-S (~10nmol) を加えて4℃で一晩放置する。サンプルに最終で4mMになるようにTCEPを加え室温で15分放置した後、未反応のPuro-F-Sをエタノール沈殿で取り除き、未反応のBiotin-loopを取り除くために以下の条件でHPLC精製を行う。

カラム ; nacalai tesque CSOMOSIL 37918-31 10x250mm C18-AR-300(Waters)

BufferA ; 0.1M TEAA、BufferB ; 80% アセトニトリル (超純水で希釈したもの)

流速：0.5ml/min (B%:15-35% 33min)

HPLCの分画は18%アクリルアミドゲル（8M尿素、62℃）で解析し、目的の分画を減圧下で乾燥させた後、DEPC処理水で溶かして、10pmol/ $\mu$ lにする。

【0052】

## 2. 抗体様ペプチドの鑄型DNA作成

抗体様ペプチドの鋳型DNAは同一分子内に少なくとも2つ以上のS-S結合を形成させるために、一つのペプチド内に4つ以上のシステイン残基を含ませる。したがって鋳型DNAはシステインに対応するコドン (UGU、UGC) のうちどれかを4つ以上含む配列を作成する。

本実施例では、下記アミノ酸配列（配列番号2又は3）を有するタンパク質をコードする下記DNAライブラリ（配列番号4又は5、ただしこの配列は相補的な配列）をDNA合成機（Applied Biosystems社製：3400）を用いて固相合成法によって合成する。

【0053】

配列番号 2 : Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xa  
a-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

配列番号 3 : Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

配列番号 4 : tttccccgcccccgctcctGCTTCCGCCgtgatgatgatgatgGCCTCCGCTTGGAGGGCCGG  
AGGGNNNNNNNNNNNNACANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNACANNNNNNNNNNNNACANNNNNNNNNNNNACANNNN  
NNNNNACANNNNNNNNNNACANNNNNNNNNNNNNCATGGTGGCTTGTAGTTGTAGAATGTAAAATGTAATG

配列番号 5 : CATGGTGGCTTGTAGTTGTAGAAATGTAAATGTAATGNNNNNNNTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

NNNNNNNTGTNNNNNNNTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNTGTNNNNNNNNNTGTNNNNNNNNNNNNNC  
CCTCCGGCCCTCCAAGCGGAGGCcatcatcatcatcatcacGGCGGAAGCaggacgggggggcggggaaa

【0054】

また、これを鋳型にしてDNAプライマー（配列番号6：CATTACATTTTACATTCTACAACCTACAAGCCACCATG、及び配列番号7：TTTCCCCGCCCGCCGTCCT）を用いてPCR（条件：熱変性 95℃ 2分の後、熱変性 95℃ 30秒、アニーリング 69℃ 15秒、伸長反応 72℃ 45秒、サイクル数 30回）を行い、エタノール沈殿により精製した後、T7プロモーター配列と非翻訳領域配列をもつDNA（以下、T7Ωと略す）（配列番号8：GATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAAGTATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTACATTTTACATTCTACAACCTACAAGCCACCATG）をプライマーなしのPCR（条件：熱変性 95℃ 2分の後、熱変性 95℃ 30秒、アニーリング 60℃ 15秒、伸長反応 72℃ 50秒、サイクル数 30回）をおこない連結し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行うことで精製する。これにより、5'側にT7、Cap、オメガ配列、Kozak配列、3'末端にx6ヒスチジンタグの他にスパーサーDNAの一部と相補なタグ配列（5'側-aggacggggggcggggaaa（配列番号9）アンダーラインはスパーサー配列と相補な部分）を含む鋳型DNAが合成される。

【0055】

### 3. 転写

上記工程 2 で合成したDNAを鋳型として以下のようにin vitro転写をプロメガ社のプロトコルに従い行なう。DNA 8  $\mu$ gに対し、m7G Cap Analog (Promega社) を最終濃度が320  $\mu$ Mになるように加え、37℃で1時間反応させる。次にDNase、フェノール・クロロホルム処理した後、DS Primer Remover (Edge Biosystems) で精製し定量する。

【 0 0 5 6 】

#### 4. mRNAとPM付きスパーサーDNAの結合

5' キャップ及び3' にタグ配列を持ったmRNA 300pmolに、PM付きスパーサーDNAを300pmol、10xLigation Buffer (TaKaRa) 6  $\mu$ l、DMSO 2.5  $\mu$ l、を加え55  $\mu$ lになるようDEPC処理水を加える。熱湯上で85℃から35℃へ20分かけてアニーリングし、15unit T4 Polynucleotide Kinase (TaKaRa、2.5  $\mu$ l)、100unit T4 RNA Ligase (TaKaRa、2.5  $\mu$ l) を加え、25℃ 45分反応させる。サンプルをRNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) で処理した後、さらにDS Primer Removerで精製する。

図2に、mRNAへPM付きスパーサーDNAを共有結合させたものの概略図を示す。図2中、Pはピューロマイシン、Bはビオチン、ATCGuはDNA、RNAシーケンスを示している。大文字で示した部分は制限酵素PvuIIサイト（四角枠で囲った部分）を含むDNA部分、小文字で示した部分はmRNAで、3'末端側のDNAと相補鎖を形成している部分がTag配列に結合している。RNAの3'末端とDNAの5'末端は" T4 RNA Ligase"と示した部分でライゲートされている。

【 0 0 5 7 】

## 5. PM付きスパーサーDNA-mRNA複合体のビーズ上への結合

上記のように合成した、PM付きスパーサーDNAとmRNAの複合体を、直径 $2.3\mu\text{m}\pm0.3\mu\text{m}$ のアビジンビーズ (MAGNOTEX-SA、TaKaRa、9088) へ、添付のプロトコルに基づき以下のようにして結合させる。

60  $\mu$ lのアビジンビーズを200  $\mu$ lのx1 Binding Buffer (添付されたもの) で2回、マグネットスタンドを用いてアビジンビーズを沈殿させ、上清を交換することで洗浄する。洗浄後、沈殿させたビーズへ、上記2-2で合成したPM付きスパーサーDNAとmRNAの複合体を48 pmol加え、1 x Binding Buffer (添付されたもの) を合計で120  $\mu$ lになるように加え、10分間室温で静置する。その後、上記のように、200  $\mu$ lの1 x Binding Buffer (添付されたもの) でビーズを洗浄することで、ビーズに結合しなかったPM付きスパーサーDNAとmRNAの複合体を取り除く。さらに、20 x Translation Mix (Ambion) 10  $\mu$ l、DEPC処理水190  $\mu$ lを加え、同様にビーズを洗浄する。

【 0 0 5 8 】

## 6. 翻訳

上記のビーズをマグネットスタンド上で沈殿させ、無細胞翻訳系 (Retic Lysate IVT K



it, Ambion社, 1200) を300 $\mu$ l加え、30℃15分翻訳反応を行う。その後、MgCl<sub>2</sub>、KClをそれぞれ最終で63mM、750mMになるように加えて37℃で1.5時間放置する。サンプルは、約1時間毎に軽く攪拌する。上記のようにビーズを沈殿させ、SUPERase<sup>®</sup>·In (Ambion社、2694) 20unitを含んだ1 x Binding Buffer (添付されたもの) 200 $\mu$ lで2回ビーズを洗浄する。

#### 【0059】

##### 7. 逆転写

洗浄後、上記と同様にして沈殿させたビーズに対して、TaKaRa BIOMEDICALS社添付のプロトコルに従い、80 $\mu$ lのスケールで逆転写酵素M-MLV (TaKaRa、2640A) を用いて42℃10分間、逆転写反応を行う。その後に上記と同様にして、1 x Binding Buffer (添付されたもの) 200 $\mu$ lでビーズを洗浄する。

#### 【0060】

##### 8. 酸化還元処理

上記工程6及び7で翻訳されてビーズに固定化されたペプチドを100mMのDTT (ジチオスレイトール) を用いて室温、1時間反応させ還元したのち、Washing Buffer (Tris-HCl pH 8.0, NaCl 100mM) 200 $\mu$ lで2回ビーズを洗浄する。次にペプチドを酸化するためにo-ヨードソ安息香酸50mMを用いて室温で10分、pH.7の50mMリン酸バッファー中で反応後、Washing Buffer (Tris-HCl pH.8.0, NaCl 100mM) 200 $\mu$ lでビーズを2回洗浄する。

#### 【0061】

##### 9. ビーズからDNA-タンパク質を回収

沈殿させたビーズに対して、添付のプロトコルに従い、40 $\mu$ lのスケールで24unitの制限酵素PvuII (TaKaRa) で37℃1時間放置することでビーズ上のDNA-タンパク質をビーズから切り離す処理を行う。ここでは特に、ビーズとDNA-タンパク質の非特異的な吸着を避けるために、BSAを最終0.1mg/mlになるように加える。その後、上記と同様にしてビーズを沈殿させ、上清を新しいサンプルチューブに移す。

#### 【0062】

##### 10. Hisタグ精製

Qiagen社のプロトコルに従い、サンプルを等量のLysisバッファー (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, imidazole 10mM, Tween20 0.05%, pH8.0) に希釈し、20 $\mu$ lのNi-NTAビーズ (Ni-NTA Magnetic Agarose Beads, QIAGEN社、36111) を加え、室温で40分攪拌しながら放置する。上記と同様にしてマグネットスタンドでNi-NTAビーズを沈殿させ、100 $\mu$ lのWashバッファー (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, imidazole 20mM, Tween20 0.05%, pH8.0) で軽く洗浄する。ビーズを沈殿させた後、Eluteバッファー (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, imidazole 250mM, Tween20 0.05%, pH8.0) を15 $\mu$ l加え1分間室温で放置し、DNA-タンパク質を溶出させる。

#### 【0063】

##### 11. 選択過程

上記工程10で溶出したDNA-タンパク質は、ビオチン-セルロースゲル (sigma社) を充填したカラムに流し、溶出されたものを回収する。次にこれとFluorescein biotin (5-((N-(6-(biotinyl)amino)hexanoyl)amino)pentyl)thioureidyl)fluorescein (Molecular Probes社) をBinding buffer (50mM リン酸バッファー、100mM NaCl) で混合し、25℃で1時間インキュベーションする。次にアビジンビーズ (MAGNOTEX-SA、TaKaRa社) 20 $\mu$ lを加え、室温で10分静置する。ここでマグネットを使いビーズを集めてバッファー交換する。Binding bufferで3回、ビーズを洗浄した後、Elution buffer (50mM リン酸バッファー、100mM NaCl, 50mM DTT) を加えて1時間、室温で静置する。マグネットでビーズを底に集めた後、上清を回収する。

#### 【0064】

##### 12. PCRによる選択分子のDNA増幅

上記工程11で回収したDNA-タンパク質を2 $\mu$ l取り、最終的な体積が50 $\mu$ lになるように調整してPCR反応に供する。この際、プライマーは $\Omega$ -RT-L (5'-CAACA ACATT ACATT TTA



CA TTCTA CAACT ACAAG CCACC-3' (配列番号 10) Ytag-R5'-TTTCC CCGCC CCCC TCCT-3' (配列番号 11) を用い、TaqポリメラーゼはTaKaRa Ex Taq (Takara社)、反応条件は熱変性 95℃ 2分の後、熱変性 95℃ 30秒: アニール 69℃ 15秒: 伸長反応 72℃ 45秒のサイクルを30回繰り返す。プライマーを除くためにプライマーリムーバー (Edge Science社) を用いて精製後、エタノール沈殿する。

【0065】

#### 13. T7プロモーター領域連結のためのPCR

上記工程12で得られたDNAをRNA化するためにT7プロモーターを連結する。そのため、T7プロモーター配列と非翻訳領域配列をもつDNA (T7Ω) (配列番号5) を用いてプライマーなしのPCRをおこない連結し精製する。(上記工程2と同じ)

【0066】

#### 14. 選択サイクルの繰り返し

上記工程3で得たDNAは再度、上記工程3に戻し、転写を行い、以下、工程4~13を3回繰り返す。

【0067】

#### 15. シーケンス

上記工程14までで、最終的にこのサイクルを4回ほど回して得られたPCR産物はプライマー (NewLeft) を用いてシーケンスを行う。その際、最初のライブラリーと各サイクルで得られたPCR産物も同時にシーケンスを行い、ランダムな配列が特定の配列に収束することを確認する。そこで、PCR産物をクローニングし、20本のクローンを選びだし、再度、シーケンスを行う。シーケンス結果からホモロジー配列を抽出する。

【0068】

#### 16. 有機合成

上記工程15で得られたDNAのホモロジー配列に基づいてアミノ酸配列に直し、有機的にペプチドの固相合成法によってペプチドを合成、ペプチドを固相から切り離す前に脱保護の後に上記工程8の酸化還元処理を行ったのち、切り離し回収する。

【0069】

#### 17. 結合アッセイ

合成されたペプチドが実際にFITCと結合能があるかどうかを調べるために蛍光偏光解消法を用いて解離定数を測定する。

なお、参考のため、図1に上記実施例のフローを示す概略図を示す。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】 図1は、本発明の一実施態様に係るスクリーニング方法の概要を示す図である。

【図2】 図2は、mRNAへ、ピュロマイシン付きスパーサーDNAを共有結合させたものの概略図を示す。

【配列表】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Biovision Capital

&lt;120&gt; A method of screening a useful protein

&lt;130&gt; BVCA0301Y1

&lt;150&gt; JP 2003-205139

&lt;151&gt; 2003-07-31

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 55

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (20)..(20)

&lt;223&gt; Biotin is bonded to the 20th cytosine.

&lt;400&gt; 1

cccggtgcag ctgtttcatc cggaaacagc tgcaccccc gccgcccccc gtcct

55

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1)..(4)

&lt;223&gt; "Xaa" = any amino acids.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<222> (6)..(8)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(12)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(17)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (19)..(22)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24)..(31)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (33)..(36)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys  
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa  
35

<210> 3

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(12)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(15)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17)..(21)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (23)..(27)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(31)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (33)..(36)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<400> 3

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys  
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa  
35

<210> 4

<211> 215

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence



<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (71)..(82)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (86)..(109)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (113)..(124)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (128)..(139)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (143)..(151)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (155)..(163)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (167)..(178)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<400> 4  
tttccccgcc ccccgctcctg cttccgccgt gatgatgatg atgatggcct ccgcttggag 60  
ggccggaggg nnnnnnnnnn nnacannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnna cannnnnnnn 120  
nnnnacannn nnnnnnnnna cannnnnnnn nacannnnnn nnnacannnn nnnnnnnnca 180  
tggtggcttg tagttgtaga atgtaaaatg taatg 215

<210> 5  
<211> 215  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (38)..(43)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (47)..(73)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (77)..(82)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (86)..(100)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (104)..(118)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (122)..(130)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (134)..(145)  
<223> "n" = a, t, g, or c.

<400> 5  
catggtggct tgtagttgta gaatgtaaaa tgtaatgnnn nnntgtnnnn nnnnnnnnnn 60  
nnnnnnnnnn nnntgtnnnn nntgtnnnnn nnnnnnnnnn tgtnnnnnnn nnnnnnnntg 120  
tnnnnnnnnn tgtnnnnnnn nnnnccctc cggccctcca agcggaggcc atcatcatca 180  
tcatcacggc ggaagcagga cggggggcgg ggaaa 215

<210> 6

<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6  
cattacattt tacattctac aactacaagc caccatg 37

<210> 7  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 7  
tttccccgcc ccccgctcct 19

<210> 8  
<211> 117  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8  
gatcccgcca aattaatacg actcactata ggggaagtat ttttacaaca attaccaaca 60  
acaacaacaa acaacaacaa cattacattt tacattctac aactacaagc caccatg 117

<210> 9  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9  
aggacggggg gcggggaaa 19

<210> 10

<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 10  
caacaacatt acattttaca ttctacaact acaagccacc 40

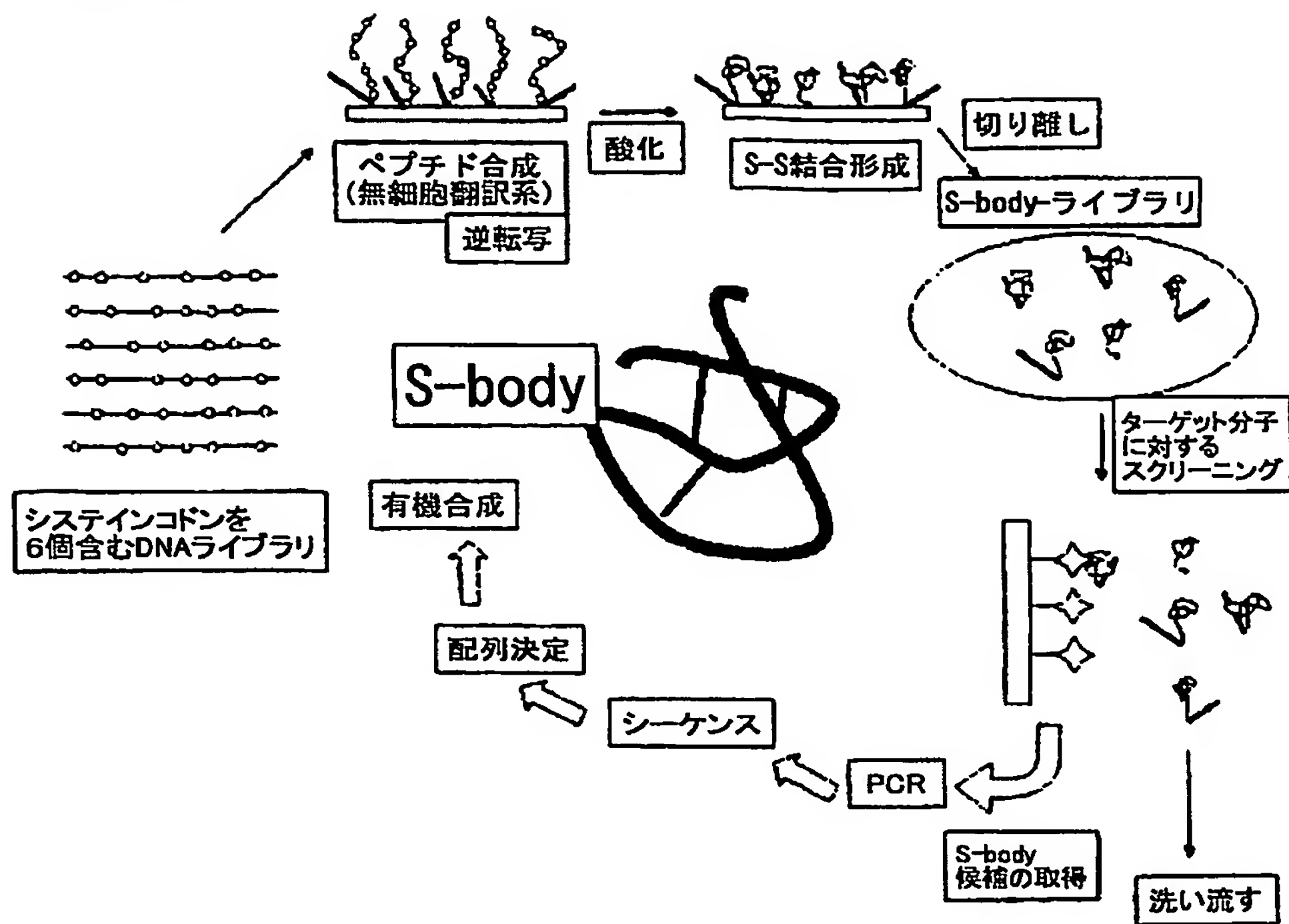
<210> 11  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

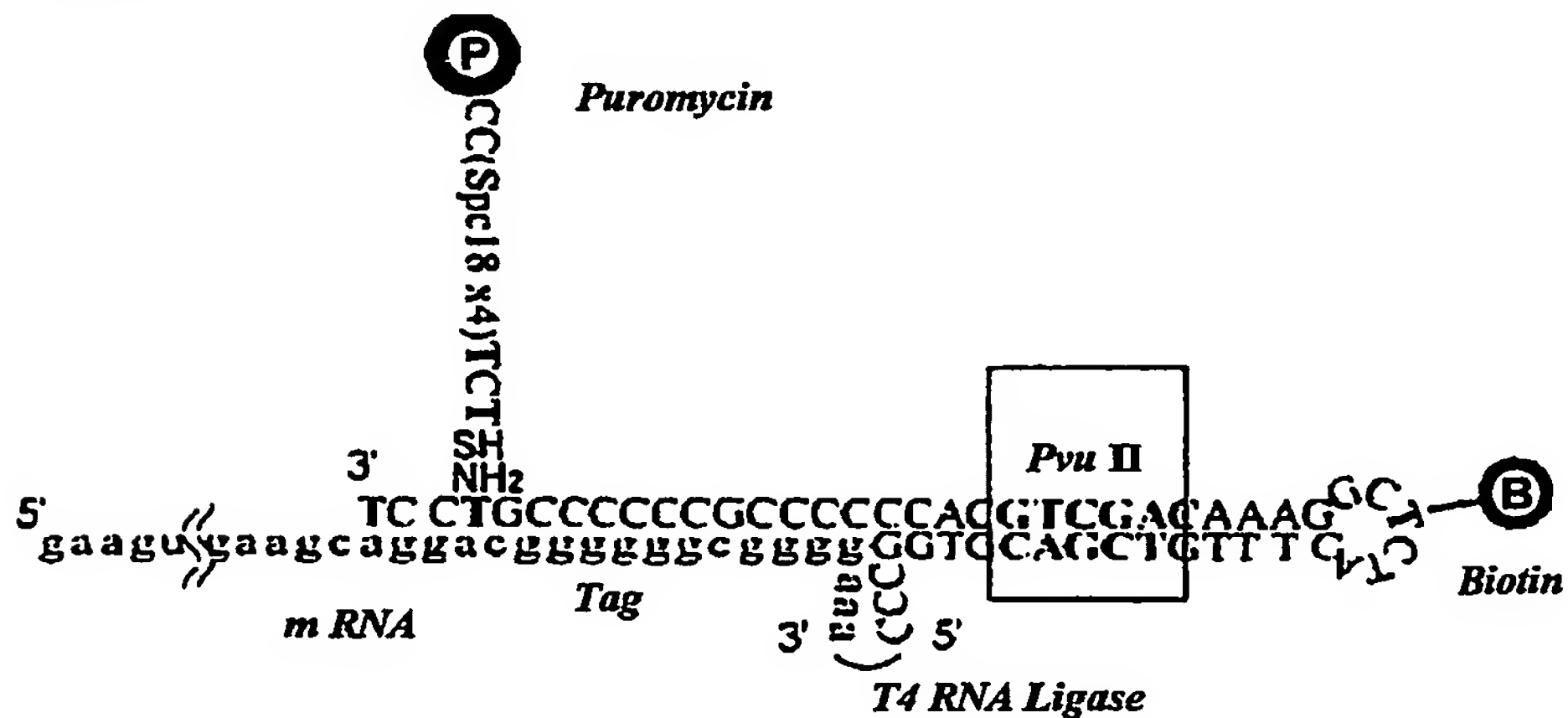
<400> 11  
tttccccgcc ccccgctct 19



【書類名】 図面  
【図 1】



【図 2】



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 有用なタンパク質を設計する方法、そのようなタンパク質をスクリーニングする方法等を提供すること。

【解決手段】 本発明の課題は、システイン残基をランダムにアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合をランダムに有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質を特定する方法であって、(a) 少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピューロマイシン連結体(群)を得る工程；(b) 工程(a)で得られたmRNA-ピューロマイシン連結体(群)と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を調製する工程；及び(c) 工程(b)において調製されたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)と1以上の標的物質とを接触させ、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程を含む上記スクリーニング方法等によって解決される。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 BVCA0301Y1  
【提出日】 平成16年 6月 2日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-416228  
【承継人】  
【住所又は居所】 東京都目黒区駒場 4 丁目 3 番 3 7 号  
【氏名又は名称】 有限会社ジーン・フィールド  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100102978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 清水 初志  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100108774  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 041092  
【納付金額】 4,200円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 承継人であることを証する書面 1  
【援用の表示】 平成 1 6 年 6 月 2 日提出の特願 2 0 0 3 - 2 0 5 1 3 9 の手続補  
足書に添付のものを援用する。  
【物件名】 代理権を証明する書面 1  
【援用の表示】 平成 1 6 年 6 月 2 日提出の特願 2 0 0 3 - 2 0 5 1 3 9 の手続補  
足書に添付のものを援用する。



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 4 1 6 2 2 8
受付番号	5 0 4 0 0 9 2 8 3 7 0
書類名	出願人名義変更届
担当官	小松 清 1 9 0 5
作成日	平成 1 6 年 7 月 1 2 日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【承継人】

【識別番号】	504212817
【住所又は居所】	東京都目黒区駒場 4 丁目 3 番 3 7 号
【氏名又は名称】	有限会社ジーン・フィールド

## 【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】	清水 初志
----------	-------

## 【承継人代理人】

【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】	橋本 一憲
----------	-------

特願 2 0 0 3 - 4 1 6 2 2 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 2 4 4 1 4 8 8 ]

1. 変更年月日 2 0 0 2 年 1 2 月 6 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都港区虎ノ門 4 - 1 - 1  
氏 名 バイオビジョン・キャピタル株式会社
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 6 月 2 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都港区西新橋 1 - 1 0 - 2 住友生命西新橋ビル 8 階  
氏 名 バイオビジョン・キャピタル株式会社

特願 2 0 0 3 - 4 1 6 2 2 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 4 2 1 2 8 1 7 ]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 6 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都目黒区駒場 4 丁目 3 番 3 7 号

氏 名

有限会社ジーン・フィールド



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**